Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H.-M. Altmann

Elektronenmikrokopische Untersuchungen über die Insulinwirkungen in proximalen Tubuluszellen der Rattenniere

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Monika Warmuth-Metz
aus Schweinfurt/Bayern

Würzburg, den 25.6.1980

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. H.-W. Altmann

Elektronenmikrokopische Untersuchungen über die Insulinwirkungen in proximalen Tubuluszellen der Rattenniere

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Monika Warmuth-Metz
aus Schweinfurt/Bayern

Würzburg, den 25.6.1980

Referent:	Prof. Dr. med. U. Pfeifer
Korreferent:	Prof. Dr. med. H.-W. Altmann
Dekan:	Prof. Dr. med. K.-H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 30.7.1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A.	Einleitung	1
B.	Methoden	2
	1. Tiermaterial	2
	2. Intraperitoneale Insulinapplikation (Hauptversuch)	2
	3. Lokale Insulinapplikation (Zusatzversuch)	3
	4. Gewebsverarbeitung	4
	5. Quantitative Auswertung der autophagen Vakuolen	5
C.	Befunde	8
	1. Morphologie der autophagen Vakuolen	8
	2. Quantitative Ergebnisse	10
D.	Diskussion	13
E.	Zusammenfassung	19
F.	Abbildungen	21
G.	Literaturverzeichnis	31

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543521_0007

EINLEITUNG

Die Wirkung des Insulins besteht nach neueren Erkenntnissen nicht nur darin, daß anabole Vorgänge der Zelle stimuliert werden. Ebenso bedeutsam scheint die Hemmung kataboler Prozesse, wofür es nicht nur biochemische, sondern auch morphologische Belege gibt.

Ein biochemisch gut untersuchtes Teilphänomen des intrazellulären Katabolismus ist die Proteindegradation (Übersicht bei Goldberg u. St.John, 1976). Insulin bewirkt an der perfundierten Leber eine erhebliche Hemmung dieses Vorganges (Mortimore u. Mondon, 1970). Morphologisch faßbar ist als kataboler Vorgang die zelluläre Autophagie, bei der kleine Zytoplasmabestandteile segregiert und dann lysosomal abgebaut werden. Auch dieser Vorgang wird in der Leber durch Insulin gehemmt (Pfeifer, 1978).

An der Niere, deren Bedeutung als Stoffwechselorgan in zunehmendem Maße erkannt wird (Schmidt u. Dubach, 1976), ist über die intrazelluläre Proteindegradation noch kaum etwas bekannt. Morphologische Untersuchungen haben aber gezeigt, daß autophage Vakuolen in den Tubuluszellen der Niere (Pfeifer u. Scheller, 1975) ebenso häufig sind wie in der Leber (Pfeifer u. Bertling, 1977), und daß die Autophagie in beiden Organen denselben tageszeitlichen Schwankungen unterliegt. Es liegt deshalb nahe, einen gemeinsamen, möglicherweise hormonellen, Regulationsmechanismus anzunehmen, wobei Insulin eine Rolle spielen könnte. Da über Wirkungen des Insulins am Nierenparenchym überhaupt noch sehr

wenig bekannt ist, soll in der vorliegenden Arbeit geprüft werden, ob Insulin an Nierentubuluszellen die zelluläre Autophagie in ähnlicher Weise beeinflußt wie in der Leber.

METHODEN

1. Tiermaterial

Es wurden männliche Albinoratten (Spraque-Dawley) der Lieferfirma Wiga (Sulzfeld) verwendet. Ihr Gewicht am jeweiligen Tötungstermin betrug durchschnittlich 290 g.

2. Intraperitoneale Insulinapplikation (Hauptversuch)

Insgesamt wurden 45 Versuchstiere verwendet. Je drei Ratten wurden in einem Einzelversuch zusammengefaßt. Den Tieren wurden fünf I.E. Insulin pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Je ein Tier wurde sofort nach der Injektion getötet, die beiden anderen zu beliebigen, unterschiedlichen Zeitpunkten, zwischen 6 und 33 Minuten nach der Injektion. Da die Zahl der autophagen Vakuolen der Rattenniere tageszeitlichen Schwankungen unterliegt (Pfeifer u. Scheller, 1975), wurden die Versuche stets zwischen 10.30 Uhr und 11.30 Uhr durchgeführt, zu einer Zeit also, zu der das normale tageszeitliche Maximum eben erreicht wird. Pro Versuchstag konnten 6 bis 9 Tiere, in Dreiergruppen zusammengefaßt, injiziert und getötet werden. Dabei

wurde die linke Niere in Äthernarkose entnommen. Eine etwa 1mm dicke Scheibe aus der oberflächlichen Rindenschicht wurde in kleine Würfel von 1mm Kantenlänge geschnitten und in 1,5% phosphatgepuffertem Osmiumtetroxid zwei Stunden lang bei 4° C fixiert.

3. Lokale Insulinapplikation (Zusatzversuch)[1]

Insgesamt 8 Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion einer 10%igen Chloralhydratlösung (1,7 bis 2,5 ml pro Tier) anästhesiert. In Seitenlage wurde die Bauchhöhle durch einen linksseitigen Flankenschnitt eröffnet und mit 3 bis 4 Haken offengehalten. Um ein Auskühlen oder Austrocknen zu vermeiden, wurde körperwarmes Paraffin in die Bauchhöhle gegossen. Nach Aufsuchen der Niere wurde sie von ihrer Fett- und Bindegewebskapsel so befreit, daß die Oberfläche und der Gefäßstiel unverletzt blieben. Anschließend wurde die Niere in eine eigens dafür angefertigte Schale gebracht und ohne Zug auf den Gefäßstiel fixiert. Die Nierenoberfläche war immer mit Paraffinöl bedeckt.

Bei Betrachtung der Niere mit dem Stereomikroskop waren die oberflächlichen Tubuli gut zu erkennen. Kriterium der guten Durchblutung war das offene Lumen der Tubuli (Haussen, 1960). Nur in solchen Fällen wurde der Versuch durchgeführt.

---

[1] Für die Einführung in die Auftropftechnik an der freigelegten Rattenniere danke ich Prof. Dr. K.H. Langer, Path. Inst. der Universität Mainz, recht herzlich.

Unter Lupenkontrolle wurde der eine Pol der Niere ca. 15 Minuten lang mit Insulin (40 bis 160 mU/ml, verdünnt in Ringerlösung), der andere mit Ringerlösung ohne Zusatz betropft. Die Lösungen waren mit Lissamin-Grün angefärbt, um die Tropfen möglichst genau lokalisieren und ihre Resorption beobachten zu können. Die oberflächliche Rindenschicht wurde dann durch Betropfen mit 1,5% Osmiumtetroxid intravital fixiert (Thoenes u. Langer, 1969). Nach Abklemmen des Nierenstiels wurden flache Schnitte aus der betropften Stelle entnommen. Durch pyramidenförmiges Zuschneiden mit der oberflächlichen Schicht als Basis der Pyramide konnte diese Schicht auch noch der Weiterfixation und während des Einbettungsvorganges identifiziert werden.

4. Gewebsverarbeitung

Zum Entwässern wurden die Gewebsproben je zweimal 10 Minuten Äthanol in aufsteigenden Konzentrationen ausgesetzt (50, 70, 90 %) und dann je zweimal 15 Minuten in absolutem Alkohol belassen. Danach wurden sie über Propylenoxid in Epon eingebettet.

Beim Hauptversuch wurden pro Tier von 3 bis 5 Eponblöcken zunächst Semidünnschnitte von ca. 1µm Dicke hergestellt und teils mit verdünnter Giemsalösung, teils mit Perjodsäure-Silbermethenamin nach Movat gefärbt. Die proximalen Anteile des Tubuluskonvolutes waren, in den nach Giemsa gefärbten Schnitten, im Lichtmikroskop an den zahlreich vorhandenen dunkel-

blau angefärbten Lysosomen leicht zu erkennen; an den Silbermethenaminschnitten war der Bürstensaum des proximalen Tubulus sehr deutlich dunkelbraun dargestellt. Jeweils ein Block pro Tier wurde so für die Elektronenmikroskopie zugespitzt, daß möglichst viel proximaler Tubulus in der Schnittfläche enthalten war.

Da in den Gewebsproben des Zusatzversuches nur eine sehr dünne Schicht ausreichend fixiert war, wurden hier keine Semidünnschnitte angefertigt. Als Kriterium für eine gelungene Fixation diente das Phänomen der offenen Tubuli (Abb. 2); war es nicht erfüllt, so wurde der betreffende Gewebsblock verworfen.

Die Dünnschnitte (Reichert OMU 2) wurden auf mit Formvar belegten Kupfernetzen aufgefangen, mit Bleicitrat kontrastiert und mit einem Siemens Elmiskop I bei 60 kV Beschleunigungsspannung untersucht.

5. Quantitative Auswertung der autophagen Vakuolen

Autophage Vakuolen werden in den Tubuluszellen der Rattenniere so selten gefunden, daß es aussichtslos ist, sie anhand von nach Zufallskriterien aufgenommenen photografischen Bildern zu registrieren. Sie müssen vielmehr direkt am Elmiskop gesucht werden.

Bereits in anderen Arbeiten bewährt haben sich als Flächeneinheit die annähernd quadratischen Netzausschnitte der Kupferträgernetze. Die Größe der einzelnen

Flächen wurde nach einer Methode bestimmt, bei der die Positionsänderung des Objekttisches in den beiden Koordinaten mit Hilfe eines Digitalzählers am Transportmechanismus registriert wird (Pfeifer, 1976). Diese Methode hat den großen Vorteil, daß sie von der aktuellen Vergrößerung unabhängig ist.

Um die Größe der jeweils von proximalem und distalem Tubulus eingenommenen Fläche zu bestimmen, wurde von jedem der ausgewerteten 270 Quadrate eine Übersichtsaufnahme bei ca. 600-facher Vergrößerung angefertigt. Auf den 3-fach nachvergrößerten Bildern konnten die Tubuluszellen eindeutig vom Interstitium abgegrenzt werden. Der distale Tubulus war vom proximalen durch die größere Transparenz des Cytoplasmas, die höhere Dichte der Mitochondrienmatrix, und durch das Fehlen des Bürstensaumes praktisch immer abzugrenzen.

Der relative Flächenanteil der verschiedenen Gewebskomponenten wurde mit der Punktzählmethode (Weibel, 1969) ermittelt. Verwendet wurde eine Gitterfolie mit quadratischer Anordnung der Schnittpunkte. Der Abstand der aufeinander senkrecht stehenden Linien betrug 1,4 cm. Die durchschnittliche Größe der ausgewerteten Gesamtfläche pro Tier betrug 37 700 μm^2 (Standardabweichung 2 100); davon wurde vom proximalen Tubulus eine Fläche von 29 800 μm^2 (s=2 200) und vom distalen Tubulus 3 700 μm^2 (s=1 900) eingenommen. Insgesamt wurden Anschnittsflächen von $1{,}34 \times 10^6$ μm^2 für den proximalen und $0{,}17 \times 10^6$ μm^2 für den distalen Tubulus ausgewertet.

Die Flächeneinheiten wurden bei 6200-facher Primärvergrößerung mit einer Binokularlupe (9-fache Vergrößerung) durch meanderförmiges Abrastern systematisch nach autophagen Vakuolen abgesucht, wobei die im proximalen und die im distalen Tubulus gefundenen Profile getrennt registriert und ausgewertet wurden.

Der horizontale und vertikale Durchmesser, a und b, eines jeden Profils einer autophagischen Vakuole wurde mit Hilfe einer Milimeterskala, die in den Fluoreszensschirm des Elektronenmikroskops eingezeichnet ist, bestimmt. Die Anschnittsfläche jedes Vakuolenprofils wurde nach der Formel $a \times b \times \pi/4$ geschätzt, wobei eine Korrektur wegen der Verzerrung durch die schräge Position des Bildschirms während der Messung der zwei Durchmesser erforderlich ist (Pfeifer, 1976).

Die Fläche aller in den 6 Quadraten gefundenen Profile autophager Vakuolen wurde dann in Relation zur gesamten ausgewerteten Tubulusfläche gesetzt. Dieser Quotient, der dem Flächen- und somit dem Volumenanteil der autophagen Vakuolen entspricht, wurde für den proximalen und den distalen Tubulus jeweils getrennt berechnet.

BEFUNDE

1. Morphologie der autophagen Vakuolen

Es wurden nur solche Vakuolen gezählt, deren äußere Begrenzung eindeutig, zumindest zum Teil als einfache oder doppelte Membran erkennbar war, und deren Inhalt aus klar und deutlich erkennbaren Zellorganellen bestand. Die Schwierigkeit bei der Definition einer autophagen Vakuole liegt in der Abgrenzung zu späteren Abbaustadien. Diese sind oft noch mit gewisser Wahrscheinlichkeit aus den einzelnen Zellorganellen herzuleiten, doch die Differenzierung ist nicht mehr eindeutig möglich. (Abb. 4)

Je nach ihrem Inhalt lassen sich drei Kategorien autophager Vakuolen unterscheiden.

a.) Bei segregierten Mitochondrien (AV_{MITO}) ist das Vorhandensein der inneren und äußeren Membran und der Cristae zu fordern. Wenn, was sehr selten der Fall war, keine Cristae auf dem Schnitt getroffen sind, kann man auch auf einen Vergleich der Matrixdichte mit der von umliegenden, eindeutig erkennbaren Mitochondrien zurückgreifen, wobei allerdings die Anwesenheit von osmiophilen Granula zu fordern ist. Die Doppelmembran ist auch manchmal nicht zu erkennen, wenn der Schnitt fast tangential verläuft; dann muß man die Cristae zur Identifizierung heranziehen. Wenn die Membranstrukturen allerdings schon so weit desintegriert sind, daß sie zwar an ein Mitochondrion denken lassen, aber

auch von anderen Organellen, z.B. Membranvesikeln stammen könnten, werden solche Vakuolen nicht mehr registriert.

b.) Die Peroxisomen oder Microbodies (AV_{MB}) wurden anhand ihrer einfachen Membran und der feinkörnig-homogenen Matrix mit relativ geringer Elektronendichte identifiziert. Manchmal waren auch zentrale Verdichtungen oder zylinderförmige Strukturen (Langer, 1968) erkennbar.

c.) Unter der Bezeichnung ERGS wurde Vakuoleninhalt zusammengefaßt, der aus endoplasmatischem Retikulum, Ribosomen, Grundsubstanz und Golgivesikeln bestand (AV_{ERGS}).- Wenn diese Bestandteile zusammen mit Mitochondrien in einer Vakuole vorkamen (Abb. 3c), so wurde getrennt ausgemessen und getrennt gezählt.

Bei Frühstadien war die Abgrenzung nur selten schwierig. Wenn eine segregierende Membran das Cytoplasmamaterial zu mindestens drei Viertel eines kreisförmigen Profils umgab, so wurde ein derartiges Profil als autophage Vakuole mitausgewertet (Abb. 4b).

Eine Verwechslungsmöglichkeit besteht noch zwischen autophagen Vakuolen und zapfenförmigen Ausstülpungen einer Zelle in eine benachbarte Zelle. Schnittbedingt können dann ringförmige Profile mit einer Doppelmembran resultieren. Der Inhalt eines solchen Profils entspricht dann einer Cytoplasmaportion der Nachbarzelle. Solche Profile sind an einem relativ weiten und meist gleichbleibenden Abstand der Plasmamembranen leicht zu erkennen (Abb. 5).

2. Quantitative Ergebnisse

Für das distale Tubuluskonvolut ergaben sich, wohl infolge der vergleichsweise kleinen Stichprobe, so große Streuungen, daß keine statistisch gesicherten Ergebnisse zu erhalten waren. Um bei der auch im proximalen Tubulus noch erheblichen biologischen Streuung den zeitabhängigen Verlauf der untersuchten Parameter erfassen zu können, wurden für den Hauptversuch vier Gruppen gebildet:
1. Die Tiere (n=15), die sofort nach der Injektion getötet worden waren. 2. Die zwischen 6 und 14 Minuten (n=9), 3. die zwischen 15 und 22 Minuten (n=15), und 4. die zwischen 25 und 33 Minuten (n=6) nach Insulingabe getöteten Tiere.

In diesen Gruppen wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichung, sowie Standardfehler bestimmt. In den Diagrammen sind die Mittelwerte miteinander verbunden (Abb. 6 u. 7).

10 Minuten nach der Insulininjektion ist der Volumenanteil der autophagen Vakuolen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant abgesunken, und zwar auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes. Der Volumenanteil steigt dann langsam wieder an. In der vierten Gruppe ist keine signifikante Differenz zu den Kontrollen nachweisbar.

Wird der Volumenanteil der autophagen Vakuolen für die verschiedenen, segregierten Organellen getrennt aufgetragen, so zeigen die drei Verlaufskurven eine

im Prinzip gleichlaufende Tendenz (Abb. 7). Die Reduktion der segregierten Mitochondrien und Microbodies ist allerdings nur noch in der zweiten Gruppe signifikant. In der dritten und vierten Gruppe ist kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollwerten mehr festzustellen. Die Kurve der ERGS-Vakuolen sinkt langsamer ab. Der tiefste Wert wird erst in der dritten Gruppe erreicht. Nach einem leichten Anstieg liegen die Werte in der vierten Gruppe immer noch signifikant unter dem Kontrollwert.

Die anteilmäßige Zusammensetzung des in den autophagen Vakuolen eingeschlossenen Cytoplasmamaterials entspricht ungefähr den aus der Tabelle I bei Pfeifer und Scheller, 1975 kalkulierten Werten. Im Vergleich zur Zusammensetzung des Cytoplasmas (Pfeifer u. Scheller, 1975) sind Mitochondrien und noch mehr Peroxisomen deutlich überrepräsentiert (Abb. 8). In den vier Gruppen tritt keine signifikante Änderung in der Zusammensetzung des Vakuoleninhalts ein. Als Tendenz ist aber erkennbar, daß in der Gruppe zwei, also 6 bis 14 Minuten nach Insulin, der Anteil der Mitochondrien und Microbodies an den autophagen Vakuolen etwas abnimmt, was bei den Absolutwerten (Abb. 7) der Tatsache entspricht, daß bei diesen AV-Typen die Reduktion noch ausgeprägter ist als bei den AV_{ERGS}.

Beim Zusatzversuch fand man in dem mit Insulin betropften Bezirk jeweils weniger autophage Vakuolen, als in dem mit Ringerlösung betropften (Abb. 9). Die Reduktion des Volumenanteils auf knapp 80% des Kontrollwertes ist

zwar geringer als im Hauptversuch, läßt sich aber mit Hilfe des t-Testes für gepaarte Beobachtungen statistisch sichern, ausgenommen die autophagen Vakuolen mit eingeschlossenen Peroxisomen.

DISKUSSION

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, daß Insulin eine morphologisch faßbare Reaktion am proximalen Tubulus auslöst, nämlich eine signifikante Reduktion des Volumenanteils autophager Vakuolen. Dieser Effekt entspricht weitgehend dem in der Leber nach systemischer Applikation nachgewiesenen (Pfeifer, 1978). Fragt man, was dieser Abnahme der autophagen Vakuolen zugrunde liegt, so lassen sich die für die Leber angestellten Überlegungen ohne weiteres auch auf die Niere übertragen:
Eine Hemmung der Neubildung autophager Vakuolen ist sehr viel wahrscheinlicher als die theoretisch ebenfalls mögliche Verkürzung der Lebenszeit der AV.

Dagegen wäre die Frage, ob die Hemmung der Autophagie als ein unmittelbarer Insulineffekt betrachtet werden kann, oder nur als ein Phänomen der nach systemischer Applikation wohl bekannten Gegenregulation, für die Niere aufgrund des Hauptversuches allein kaum zu beantworten gewesen. Für die Leber war dies deshalb eher möglich (Pfeifer, 1978), weil hier die Hemmung der Autophagie genau der auch an der isoliert perfundierten Leber nachgewiesenen Hemmung der Proteindegradation durch Insulin entspricht (Mortimore u. Mondon, 1970). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sind vergleichbare biochemische Untersuchungen an der Niere bis jetzt noch nicht durchgeführt worden.

Die hier erstmals vorgestellten Versuche mit lokaler Insulinapplikation an umschriebener Stelle der Niere

gestatten es, sekundäre Effekte im Zuge einer Gegenregulation als Ursache der Autophagie-Hemmung auszuschließen. Denn zum einen war die beim Auftropfen verbrauchte Gesamtmenge an Insulin viel kleiner, als die zur Erzeugung einer systemischen Reaktion erforderliche. Zum anderen wäre bei einer systemischen Gegenregulation kein Unterschied zwischen den Nierenpolen zu erwarten gewesen. Man kann demnach als sicher ansehen, daß die in beiden Versuchen beobachtete Hemmung der Autophagie eine unmittelbare Reaktion der Zelle auf das, wie auch immer applizierte Insulin darstellt.

Damit ist die Frage aufgeworfen, was bisher über die Beziehung zwischen Insulin und der Niere bekannt ist (Übersicht bei Rubenstein, Mako u. Horwitz, 1975).

Nach Untersuchungen von Fine et al.,1976, spielt die Niere beim Abbau des im Organismus zirkulierenden Insulins eine sehr wichtige Rolle. Mehr als ein Drittel des im Gesamtkörper stattfindenden Insulinabbaus wird vom Nierenparenchym bewerkstelligt. Aus Versuchen mit J^{131}-markiertem Insulin ist bekannt, daß das Hormon den glomerulären Filter passiert und dann im proximalen Tubulus wieder reabsorbiert wird. Durch die sogenannte Insulinase (Glutathion-Insulin-Transhydrogenase) wird es dort abgebaut (Mahler u. Szabo, 1968; Rubenstein, 1975; Duckworth, 1978). Da die glomeruläre Filtration geringer ist als die Clearance für Insulin, muß dieses auch von den peritubulären Kapillaren aus in die proximalen Tubuluszellen gelangen (Rubenstein, 1975). Die Bedeutung dieser in der Niere lokalisierten Abbauaktivität wird daraus ersichtlich,

daß bei Hunden nach einer Nephrektomie die Abbaurate für markiertes Insulin erheblich kleiner wird (zit. nach Swenson et al., 1971, bei Rubenstein et al., 1975), was auch für den Menschen nach bilateraler Nephrektomie zutrifft (zit. nach Jorvilain et al., 1971, bei Rubenstein et al., 1975).

Mit einer Insulinwirkung auf das Nierenparenchym hat aber der erwähnte Abbau des Hormons nicht notwendigerweise etwas zu tun. Wichtiger erscheint in diesem Zusammenhang der Befund spezifischer, d.h. durch andere Peptidhormone nicht besetzbarer Bindungsstellen (Duckworth, 1978), wenngleich auch hier nicht völlig klar ist, ob diese etwas mit einer hormonellen Signalübertragung zu tun haben, oder vielleicht doch nur den ersten Schritt des vorher erwähnten Abbaus bewirken.

Daß Insulin in der Tat aber auch einen Einfluß auf die Nierenfunktion hat, zeigen einige Arbeiten, die sich mit der renalen Ausscheidung von Mineralstoffen beschäftigen. Ausgehend von der Beobachtung, daß mit Insulin behandelte Diabetiker Natrium retinieren (Katz u. Lindheimer, 1977), sind Versuche an der isolierten Hundeniere (Mizet et al., 1971) und auch an intakten Hunden (De Fronzo et al., 1976) durchgeführt worden, die zeigen, daß Insulin zu einer vermehrten tubulären Reabsorption von Natrium, Kalium, Kalzium und von Phosphat führt. Durch die letztgenannte Untersuchung wird vor allem auch belegt, daß dieser Effekt dem Insulin direkt zuzuschreiben ist; und daß die gleichartigen Effekte nach Hyperglycämie auf einer reaktiven Insulinausschüttung beruhen dürften. Daß

diese Insulinwirkung dennoch nicht unabhängig vom Glucosestoffwechsel betrachtet werden darf, zeigen die Untersuchungen von Gregg und Cohen, 1978, wonach in der isoliert perfundierten Niere bei substratfreier und damit auch glucosefreier Lösung Insulin keinen Effekt auf die Natriumrückresorption hat. Den in anderen Organen, wie Leber und Muskel, klassischen Insulineffekt, nämlich die erhöhte Glucoseaufnahme in die Zelle, hat man in der Niere bisher nicht eindeutig nachweisen können. Experimente von Mahler und Szabo, 1968, lassen aber vermuten, daß die hohe Abbaukapazität des Nierengewebes in Konkurrenz zur eigentlichen Insulinwirkung treten kann. Eine Steigerung der Glucoseaufnahme war in diesen Experimenten jedenfalls nur zu beobachten, wenn der Insulinabbau durch Alloxan vorher gehemmt worden war.

Die Vorstellung, daß Insulin an der hormonellen Regulation der Nierenfunktion beteiligt ist, und daß die Blockierung der Autophagie ein Teilphänomen des renalen Insulineffekts ist, wird noch unterstützt durch die Tatsache, daß ein anderes Hormon, nämlich das Parathormon, eine den bisher bekannten Insulinwirkungen entgegengesetzte Reaktion hervorruft. So wird die durch Insulin positiv beeinflußte tubuläre Reabsorption von Phosphat (De Fronzo et al., 1976) durch Parathormon gehemmt (Gekle, 1971), und andererseits stimuliert Parathormon die Bildung autophager Vakuolen (Pfeifer u. Guder, 1975), also wiederum das Gegenteil des Insulineffektes.

Aus der Schwundrate autophager Vakuolen sind unter günstigen Umständen Rückschlüsse auf ihre Lebenszeit und sekundär auch auf Turn-over-Raten von Cytoplasmabestandteilen möglich (Pfeifer, 1978). Im vorliegenden Versuch nimmt aber der Volumenanteil der autophagen Vakuolen nicht über die gesamte Untersuchungszeit hinweg ab, sondern nur während der ersten 10 Minuten nach der Insulininjektion. Deswegen ist eine Kalkulation der Halbwertszeit des AV-Kompartimentes nicht mit derselben Genauigkeit wie in der Leber möglich. Vergleicht man aber die relativierten Verlaufskurven (Abb. 10), so läßt sich abschätzen, daß die initiale Abfallgeschwindigkeit in der Niere in derselben Größenordnung liegt wie in der Leber, jedenfalls nicht wesentlich niedriger ist. Da der anfängliche Absolutwert für den Volumenanteil mit $5x10^{-4}$ deutlich größer ist als in der Leber, dürfte die Rate des durch Autophagie bewerkstelligten Organellenabbaus in der Niere keinesfalls niedriger liegen als in der Leber.

Es ist nicht eindeutig zu klären, warum der Volumenanteil nur auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes abnimmt, dann bereits zwischen 10 und 20 Minuten nach der Insulininjektion wieder leicht ansteigt. In der Leber hält der Insulineffekt länger an; die Menge der autophagen Vakuolen nimmt bis 30 Minuten nach der Injektion ab. Zu dieser Zeit findet man nur noch ein Zehntel des Ausgangswertes (Pfeifer, 1978). Man könnte zwar vermuten, daß das intraperitoneal applizierte Insulin bereits in der Leber größtenteils inaktiviert wird und daß die für die Organe des großen Kreislaufs noch verbleibende Menge für eine anhaltende Blockie-

rung nicht mehr ausreicht. Da aber auch bei der lokalen Insulinapplikation nur eine mäßig ausgeprägte Reduktion der autophagen Vakuolen eintritt, könnte man eher daran denken, daß die Tubuluszellen der Niere nur in begrenztem Maße fähig sind, die zelluläre Autophagie einzuschränken. Im Falle des Insulins könnte dies auf einer vergleichsweise geringen Rezeptordichte beruhen, so daß die sekundären, der Autophagie entgegengerichteten Effekte schwächer sind als beispielsweise in der Leber. Ähnliche Schlußfolgerungen könnte man auch aus den bereits bekannten Tageszeitschwankungen des Volumenanteils autophager Vakuolen ziehen. In der Leber wird nämlich in der Dunkelphase, also nach Nahrungsaufnahme ein nahezu völliger Schwund der autophagen Vakuolen beobachtet (Pfeifer u. Bertling, 1977), wogegen in der Niere in dieser Phase noch gut meßbare Werte registriert werden (Pfeifer u. Scholler, 1975).

Solche Unterschiede ändern aber nichts an der Tatsache, daß die Niere aufgrund der hier vorgelegten Befunde zu den insulinempfindlichen Organen gezählt werden muß. Zukünftigen Untersuchungen wird es vorbehalten bleiben, zu klären, ob irgendwelche funktionellen Zusammenhänge zwischen den bisher bekannten metabolischen Effekten und der Hemmung der Autophagie bestehen.

ZUSAMMENFASSUNG

Um zu überprüfen, ob die an der Leber bekannte Hemmung der Autophagie nach Insulinapplikation auch für andere Organe zutrifft, wurden analoge Versuche an der Rattenniere durchgeführt.

45 Ratten wurde in einem Hauptversuch 5 I.E. Insulin pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion (0 bis 33 Min.) getötet. Proben aus der oberflächlichen Rindenschicht der Niere wurden quantitativ im Elektronenmikroskop auf das Vorkommen von autophagen Vakuolen untersucht. Da diese im proximalen Tubulus wesentlich häufiger vorkommen und deshalb die Werte für den distalen Tubulus wegen zu großer Streuung statistisch nicht ausgewertet werden konnten, wurde nur der proximale Tubulus berücksichtigt.
Es fand sich ein starker Abfall der Zahl der autophagen Vakuolen 10 Min. nach Insulininjektion auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes. Die Werte stiegen bei 20 und 30 Min. langsam wieder an, so daß bei 30 Min. kein statistisch signifikanter Unterschied zum Ausgangswert mehr bestand.

Um die interindividuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren und die eventuellen Gegenregulationsmechanismen bei systemischer Insulinapplikation auszuschalten, wurde in einem Nebenversuch bei 8 weiteren Ratten in Narkose eine Niere freigelegt und ca. 15 Min. lang der eine Pol mit einer Insulinlösung, der andere mit Ringerlösung als Kontrolle

betropft. Nach intravitaler Fixierung wurden flache Scheiben aus der Rindenoberfläche der betropften Regionen entnommen und wie im Hauptversuch auf autophage Vakuolen ausgewertet.
Die Zahl der autophagen Vakuolen des insulinbetropften Pols betrug etwa 80 % des Kontrollwertes. Das Ergebnis ließ sich bei den Einzeltieren mit dem t-Test für gepaarte Beobachtungen statistisch sichern mit Ausnahme der segregierten Peroxisomen.

Als Ursache für den im Haupt- und Zusatzversuch gefundenen Abfall der Zahl der autophagen Vakuolen wurde eine durch Insulin bedingte Hemmung der Neubildung von AV's betrachtet.
Eine eindeutige Erklärung für den Wiederanstieg der AV's im Hauptversuch, der bei analogen Versuchen an der Leber nicht beobachtet wurde, konnten im Rahmen dieser Versuche nicht gefunden werden.
Dennoch zeigen die Ergebnisse der beiden Versuche, daß die Niere zu den insulinempfindlichen Organen gezählt werden muß.

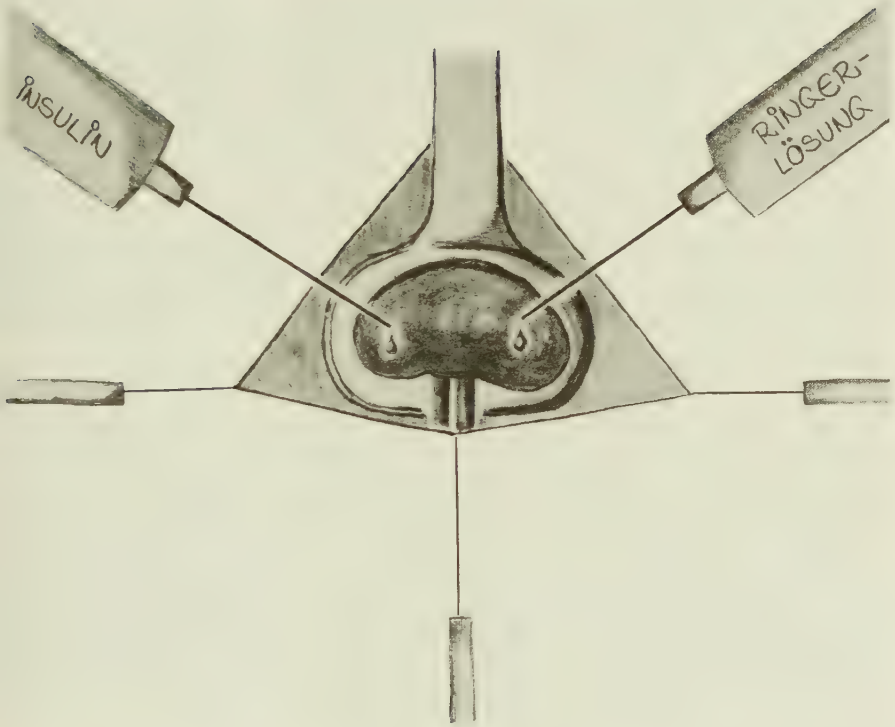

Abb. 1: Versuchsanordnung des Zusatzversuches
In der eröffneten, mit Haken fixierten Bauchhöhle wird die in einer Kunststoffschale fixierte und mit Paraffinöl bedeckte Niere am einen Pol mit Insulinlösung, am anderen Pol mit Ringerlösung betropft.

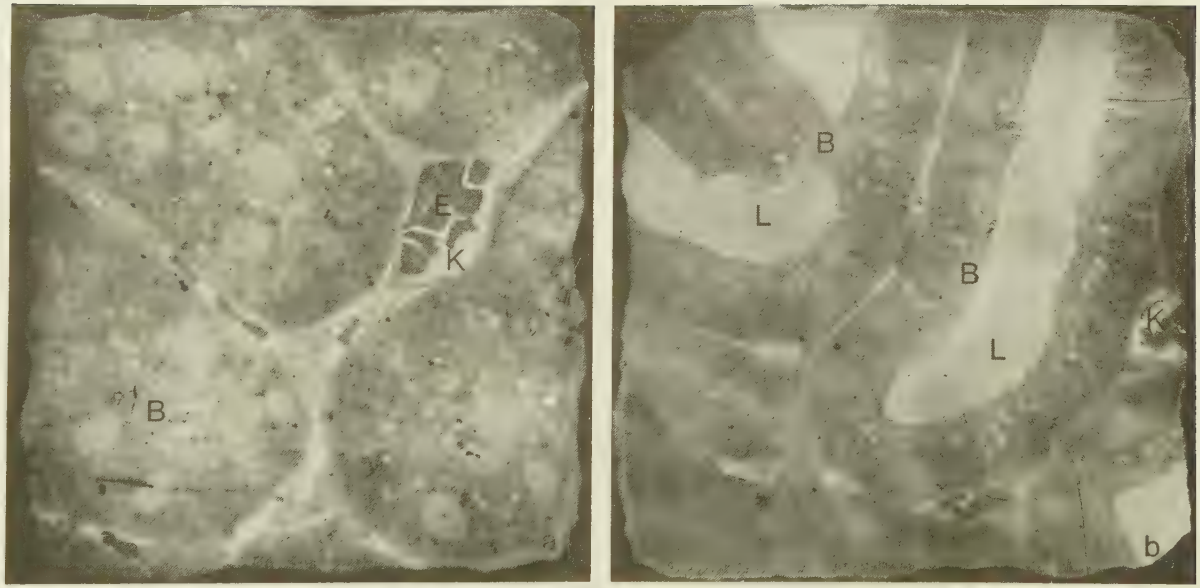

Abb. 2a,b: zeigt zwei Beispiele für die als Flächeneinheit dienenden Trägernetzquadrate mit den nicht ganz regelmäßig verlaufenden, im Bild tiefschwarzen Konturen. Das Nierengewebe ist in a durch Immersion, in b durch intravitale Auftropfung fixiert. Nach Immersion (a) sind die proximalen Tubuli geschlossen, lassen also kein Lumen mehr erkennen. Der Bürstensaum (B) ist bei der schwachen Vergrößerung schwer zu identifizieren. Im interstitiellen Gewebe erkennt man einzelne peritubuläre Kapillaren (K) mit Erythrozyten (E). Nach intravitaler Fixation (b) ist das Lumen (L) der proximalen Tubuli dagegen offen. Die Microvilli des Bürstensaumes (B) stehen weniger dicht. (14000x)

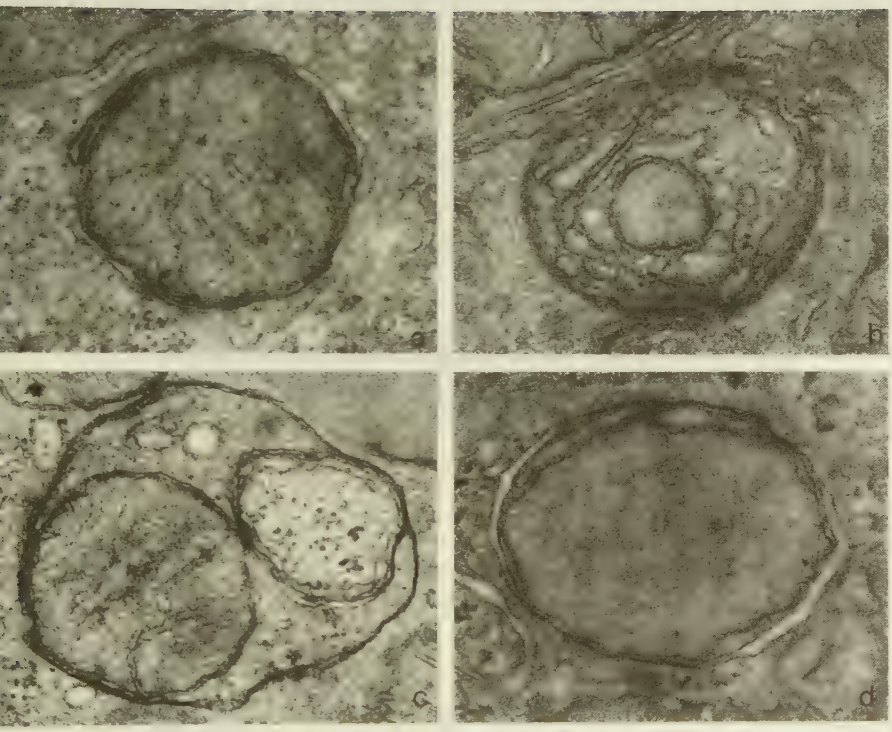

Abb. 3a-d: Typische autophage Vakuolen in proximalen Tubuluszellen.

a: segregiertes Mitochondrion, an der doppelten Mitochondrienmembran und den Cristae deutlich zu erkennen. (75000x)

b: segregiertes endoplasmatisches Retikulum, mit Ribosomen und Vesikeln des Golgiapparates. (75000x)

c: Doppelvakuole mit einem Mitochondrion, Ribosomen und segregierter Grundsubstanz. (67000x)

d: segregiertes Peroxisom, gut zu erkennen an der zentral etwas verdichteten Matrixsubstanz (dense core) und der einfachen äußeren Membran. Die teilweise Doppelung im oberen Anteil wird durch anliegende Membranen des ER vorgetäuscht. (72000x)

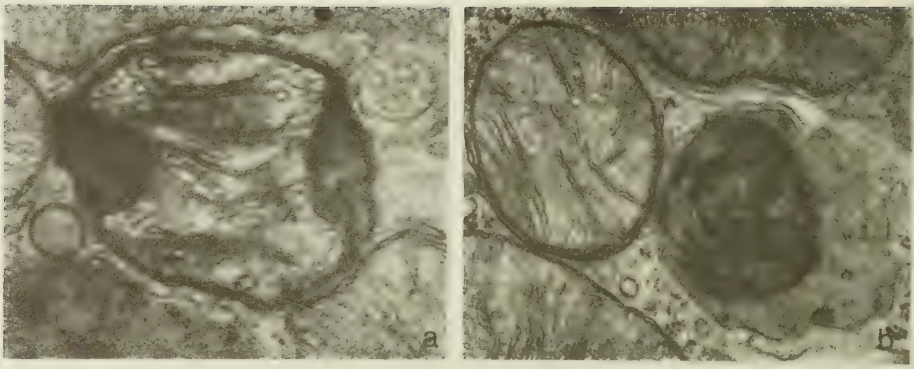

Abb. 4a,b: Vorstadien und Spätformen autophager Vakuolen. Vakuolen, deren Inhalt schon so weit abgebaut ist, daß ihre Herkunft aus den Zellorganellen nicht mehr eindeutig festzustellen ist, wurden nicht mehr gezählt.

a: Vermutlich stammt diese autophage Vakuole aus einem Mitochondrion. Die Membranen sind jedoch schon zu dicht und die Cristae nicht mehr eindeutig zu identifizieren. (Es könnten auch durch den Abbau veränderte Golgilamellen sein.) (75000x)

b: Nicht mehr identifizierbarer Vakuoleninhalt. Links daneben ein Mitochondrion in einem sehr frühen Stadium der Segregation. Da jedoch die Membran noch weniger als 3/4 eines Kreisprofils beschreibt, wurde sie definitionsgemäß nicht mit ausgewertet. (45000x)

Abb. 5: Pseudovakuole:
Im Bereich des der Basalmembran (BM) benachbart liegenden basalen Labyrinths können durch Einstülpungen der benachbarten Zellen autophage Vakuolen vorgetäuscht werden.
Das Mitochondrion ist von einer Doppelmembran umgeben, die jedoch durch den weiten und konstanten Abstand ihrer Einzelmembranen von segregierenden Membranen leicht abzugrenzen ist. (67000x)

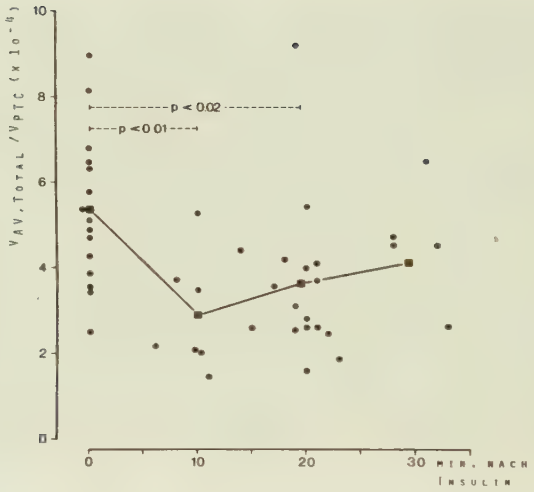

Abb. 6: Verhalten des Volumenanteils der gesamten autophagen Vakuolen im Cytoplasma der proximalen Tubuluszelle (PTC) in Abhängigkeit von der Zeit nach Insulinapplikation. (Die Punkte sind die Meßwerte für die einzelnen Tiere. Die geschlossenen Quadrate stellen die Mittelwerte für die vier gebildeten Gruppen dar.)
Während der Volumenanteil an autophagen Vakuolen in der zweiten Gruppe (10 Minuten nach Insulin) stark abgefallen ist, zeigt sich bei 20 Minuten wieder ein Anstieg. Bei 30 Minuten ist der Unterschied zum Ausgangswert statistisch nicht mehr signifikant.

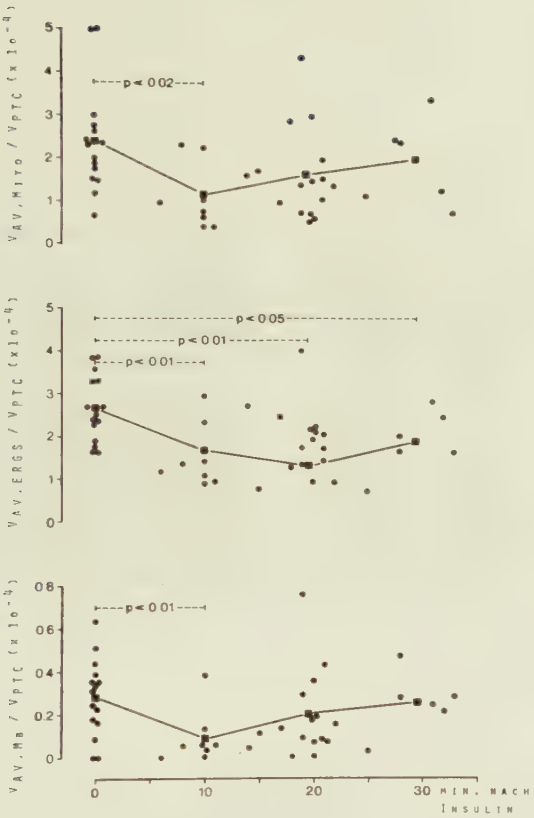

Abb. 7: Verhalten des Volumenanteils der autophagen Vakuolen in proximalen Tubuluszellen (PTC) in Relation zur Zeit nach Insulinapplikation, für die verschiedenen Organellen getrennt aufgetragen.
Der Volumenanteil der AV mit Mitochondrien ($V_{AV,MITO}$) und die mit Microbodies ($V_{AV,MB}$) als Inhalt ist in der 10-Minuten-Gruppe signifikant erniedrigt. Die Werte danach zeigen keinen signifikanten Unterschied mehr zur Kontrollgruppe.
Der Volumenanteil der AV mit eingeschlossenem ER ($V_{AV,ER}$) zeigt dagegen einen langsameren Abfall. Nach einem leichten Anstieg bleibt der Wert auch bei 30 Minuten noch signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

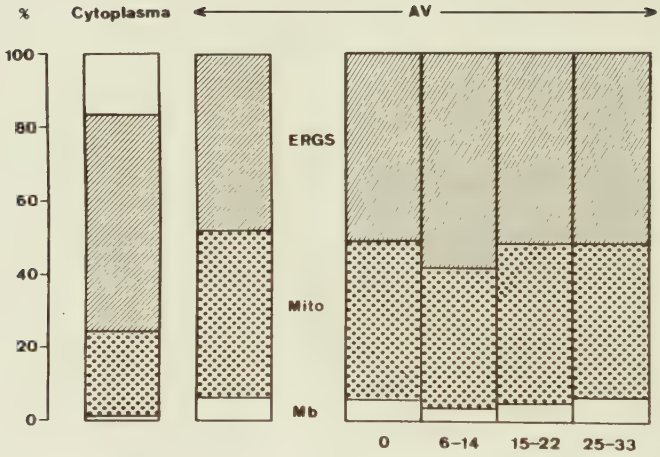

Abb. 3: Prozentuale Zusammensetzung der Organellen im Cytoplasma der proximalen Nierentubuluszelle im Vergleich zum AV-Kompartiment.
Die erste Säule zeigt die relative Zusammensetzung des gesamten Cytoplasmas (Werte aus Pfeifer u. Scheller, 1975), während die Säulen zwei bis sechs die des AV-Inhalts darstellen. In der Säule zwei sind die Mittelwerte aus dem gesamten Versuch aufgetragen; Säule drei bis sechs zeigen die prozentuale Zusammensetzung auf die einzelnen Zeitgruppen des Versuches aufgeteilt.

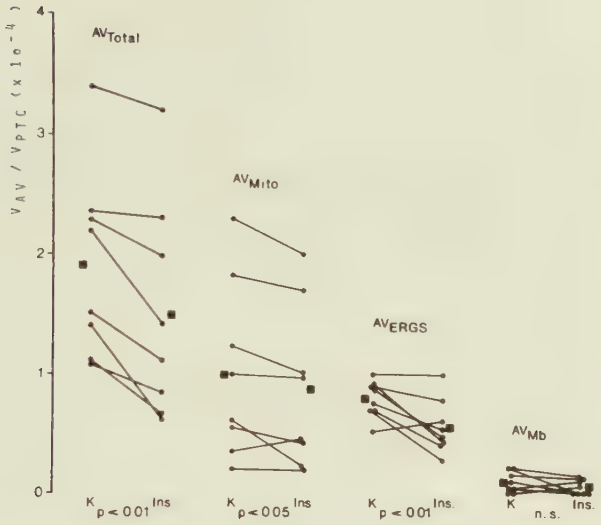

Abb. 9: Ergebnisse des Zusatzversuches
Hierbei wurde der Volumenanteil der autophagen Vakuolen des mit Kontrollösung betropften Nierenpols (linker Punkt) mit dem des insulinbetropften Pols (rechter Punkt) verglichen. Alle Einzelkolumnen zeigen für den V_{AV} unter Insulin statistisch signifikant niedrigere Werte als für den V_{AV} unter Kontrollösung.

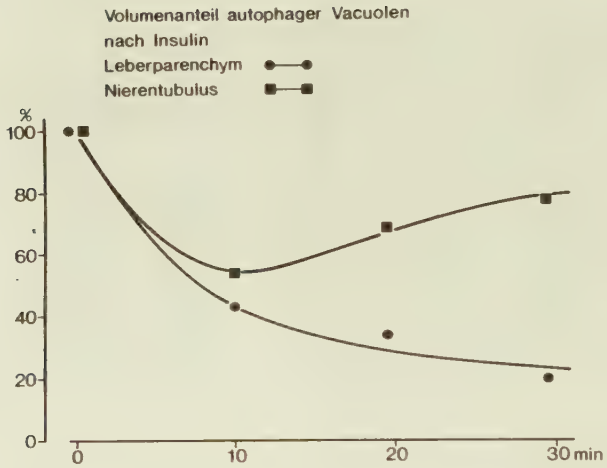

Abb. 10: Vergleich des relativierten Volumenanteils aller autophagen Vakuolen 0-30 Minuten nach Insulinapplikation im Leberparenchym und in der proximalen Nierentubuluszelle. Während die autophagen Vakuolen des Leberparenchyms auf Insulin einen stetigen Abfall zeigen, steigt der Wert für die AV in der Niere nach einem deutlichen Abfall bei 10 Minuten langsam wieder an.

LITERATURVERZEICHNIS

DE FRONZO R., GOLDBERG M., AGUS Z.	The Effects of Glucose and Insulin on Renal Electrolyte Transport J. Clin. Invest. 58, 83-90 (1976)
DUCKWORTH W.C.	Insulin and Glucagon Binding and Degradation by Kidney Cell Membranes Endocrinology 102, 1766-1774 (1978)
FINE A. THOMSON R.M., JONES J.V., MURRAY R.G., TWEDDLE A., GRAY C.E.	Renal Handling of Insulin and Thyroid Hormones in Normal Man Clin. Science and Mol. Med. 50, 435-437 (1976)
GEKLE D.	Der Einfluß von Parathormon auf die Nierenfunktion Plügers Arch. 323, 96-120 (1971)
GOLDBERG A.L., ST.JOHN A.C.	Intracellular Proteindegradation in Mammalian and Bacterial Cells Part 2 Ann. Rev. Biochem. 45, 747-803 (1976)
GREGG C., COHEN J., BLACK A., ESPELAND M., FELDSTEIN M.	Effects of Glucose and Insulin on Metabolism and Function of Perfused Rat Kidney Am. J. Physiol. 235(1), 52-61 (1978)
HAUSSEN O.E.	Early Post Mortem Renal Changes Studies in Mice with One Kidney Exterioized. II. The Functional and Early Post Mortem Morphology of the Kidney Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 49, 297-320 (1960)
KATZ A.I., LINDHEIMER M.D.	Actions of Hormones on the Kidney Ann. Rev. Physiol. 39, 97-134 (1977)

LANGER K.H. — Feinstrukturen der Mikrokörper (microbodies) des Nierentubulus Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 90, 432-446 (1968)

MAHLER R., SZABO O. — Metabolic Effects of Insulin on Rat Kidney After Inhibiting Degradation of the Hormone Endocrinology 83, 1166-1172 (1968)

MORTIMORE G., MONDON C. — Inhibition by Insulin of Valin Turnover in Liver J. Biol. Chem. 245, 2375-2383 (1970)

NIZET A., LEFEBVRE P., CRABBE J. — Control by Insulin of Sodium, Potassium and Water Excretion by the Isolated Dog Kidney Plügers Arch. 323, 11-20 (1971)

PFEIFER U. — Quantification of Rarely Occurring Structures in Elektron Microscopy Proceedings of the Fourth Int. Congress for Stereology Sept. 1975, Gaithersburg

PFEIFER U., GUDER W. — Stimulation of Cellular Autophagy by Parathyroid Hormone and Cyclic Adenosine 3'5'-Monophosphat in Isolated Tubular Fragments from Rat's Kidney Virchows Arch. B 19, 51-67 (1975)

PFEIFER U., SCHELLER H. — A Morphometric Study of Cellular Autophagy Including Diurnal Variations in Kidney Tubules of Normal Rats J. Cell. Biol. 64, 608-621 (1975)

PFEIFER U., BERTLING J. — A Morphometric Study of the Inhibition of Autophagic Degradation During Restorative Growth of Liver Cells in Rats Refed after Starvation Virchows Arch. 24, 109-120 (1977)

PFEIFER U. — Inhibition by Insulin of the Formation of Autophagic Vacuoles in Rat Liver
J. Cell. Biol. 78, 152-167 (1978)

RUBENSTEIN A., MAKO M., HORWITZ D. — Insulin and the Kidney
Nephron R 15, 306-326 (1975)

SCHMIDT U., DUBACH U.C. — Acute Renal Failure in Folate Treated Rat. Early Metabolic Changes in Various Structures of Nephron
Kidney Int. 10(4), 39-45 (1976)

THOENES W., LANGER K.H. — Die Endocytose-Phase der Eiweißresorption im proximalen Nierentubulus
Virchows Arch. B 2, 361-379 (1969)

WEIBEL E.R. — Stereological Principles for Morphometry in Electron Microscopic Cytology
Int. Rev. Cytol. 26, 235-302 (1969)

Lebenslauf

Monika Maria Sabine Warmuth-Metz, geb. Warmuth, am 26.10.1954 als Kind des Postoberinspektors Alfred Warmuth und seiner Ehefrau Kunigunde, geb. Scheller, in Schweinfurt/Bayern geboren.
Seit dem 22.12.1978 mit Artur Metz verheiratet.

1960-1961: Dr.-Pfeiffer-Volksschule Schweinfurt
1961-1964: Albert-Schweitzer-Volksschule Schweinfurt
1964-1973: Olympia-Morata-Gymnasium Schweinfurt

1973-1980: Studium der Medizin an der Universität Würzburg

1.6.1980: wiss. Hilfskraft am Pathologischen Institut der Universität Würzburg

Monika Warmuth-Metz

Andreas Staudenraus Druckerei GmbH · Münzstraße 4 · 8700 Würzburg